DiaMetra

CE

URINARY « FREE » CORTISOL

pour analyses de routine

Détermination immunoenzymatique de cortisol urinaire libre

IVD | **LOT** Voir l'étiquette externe | 2°C – 8°C | Σ = 96 tests | **RÉF DKO018**

USAGE PRÉVU

Méthode immunoenzymatique colorimétrique par compétition pour la détermination quantitative de la concentration de cortisol libre dans les urines.
Le kit Urinary Free Cortisol est destiné exclusivement à un usage en laboratoire.

1. SIGNIFICATION CLINIQUE

Le cortisol est une hormone stéroïdienne libérée par le cortex de la surrénale en réponse à l'hormone ACTH (produit par l'hypophyse) ; il est impliqué dans la réponse au stress ; il augmente la pression sanguine, la glycémie et peut être cause de stérilité chez les femmes ; il supprime le système immunitaire.
Le cortisol agit à travers les récepteurs intracellulaires spécifiques et a des effets sur de nombreux systèmes physiologiques, y compris le système immunitaire, la régulation du glucose, le tonus vasculaire, l'utilisation du substrat et le métabolisme osseux. Le cortisol est excrété avant tout dans les urines sous forme non liée (libre). Le cortisol dans le plasma est lié par la globuline liant les corticostéroïdes (CBG, transcortine) avec une affinité élevée avec l'albumine. Seul le cortisol libre est disponible aux récepteurs.
Les fonctions endogènes normales sont à la base des conséquences physiologiques du stress chronique - la sécrétion prolongée de cortisol provoque l'effort musculaire et l'hyperglycémie et supprime les réponses immunitaires/inflammatoires. Les mêmes conséquences résultent de l'usage prolongé de médicaments à base de glycocorticoïdes. Le cortisol libre représente la fraction métaboliquement active du cortisol.
En conditions normales, moins de 1 % est excrété comme tel dans les urines. Dans des conditions pathologiques (syndrome de Cushing), les taux de cortisol urinaire libre sont très élevés du fait que le cortisol plasmatique en excès ne se lie pas à la CBG et est éliminé dans les urines.
Pendant la grossesse ou le traitement aux oestrogènes et progestines, on note une augmentation du cortisol plasmatique résultant du renforcement de la synthèse de la protéine de transport, mais les taux de cortisol urinaire libre restent normaux, indiquant un bon fonctionnement de la surrénale.
Ce dosage est très utile pour évaluer le fonctionnement réel de la surrénale du moment que la partie libre est dosée et est donc métaboliquement active. De plus, l'évaluation du cortisol urinaire libre est le meilleur paramètre pour le diagnostic du syndrome de Cushing.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le cortisol urinaire (antigène) présent dans l'échantillon rentre en compétition avec l'antigène marqué à la peroxydase par rapport à l'anticorps anti-cortisol adsorbé sur microplaque (phase solide).
La séparation libre-lié est obtenue par simple lavage de la phase solide.
L'enzyme présent dans la fraction liée réagit avec le substrat (H_2O_2) et le substrat TMB (TMB), en développant une coloration bleue qui vire au jaune après ajout de la solution d'arrêt (H_2SO_4).
L'intensité de la couleur développée est proportionnelle à la concentration d'antigène marqué et est donc inversement proportionnelle à la concentration de cortisol urinaire dans l'échantillon.

3. REACTIFS, MATERIAUX ET INSTRUMENTS

3.1. Réactifs et matériaux fournis dans le coffret

1. Étalon cortisol (5 flacons, 1 mL chaque)

STD0	**RÉF DCE002/1806-0**
STD1	**RÉF DCE002/1807-0**
STD2	**RÉF DCE002/1808-0**
STD3	**RÉF DCE002/1809-0**
STD4	**RÉF DCE002/1810-0**

2. Tampon d'incubation (1 flacon, 100 mL)
Tampon phosphaté 50 mM pH 7,4 - BSA 1 g/L
RÉF DCE001-0

3. Conjugué (1 flacon, 1 mL)
Cortisol conjugué avec de la peroxydase
RÉF DCE002/1802-0

4. Microplaque coatée (1 microplaque sécable)
IgG anti-cortisol adsorbée sur microplaque
RÉF DCE002/1803-0

5. Substrat TMB (1 flacon, 15 mL)
H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (éviter le contact avec la peau)
RÉF DCE004-0

6. Solution d'arrêt (1 flacon, 15 mL)
Acide sulfurique 0,15 mol/L (éviter le contact avec la peau)
RÉF DCE005-0

7. Contrôle bas (1 flacon, 1 mL)
Prêt à l'emploi **RÉF DCE045/1801-0**

8. Contrôle élevé (1 flacon, 1 mL)
Prêt à l'emploi **RÉF DCE045/1802-0**

3.2. Réactifs nécessaires non fournis dans le coffret

Eau distillée

3.3. Matériaux et instruments auxiliaires

Distributeurs automatiques.
Lecteur pour microplaques (450 nm).

Remarques

Conserver tous les réactifs à 2÷8°C à l'abri de la lumière.
N'ouvrir le sachet de Réactif 4 (Microplaque Coatée) qu'après avoir amené celui-ci à température ambiante et refermez-le tout de suite après avoir prélevé les bandes à utiliser.
Éviter de détacher la feuille adhésive des bandes qui ne sont pas utilisées pendant l'analyse en cours.

4. PRÉCAUTIONS D'USAGE

- Les réactifs contiennent du Proclin 300^R comme conservateur.
- Éviter l'exposition du réactif TMB/H_2O_2 à la lumière directe du soleil, aux métaux et aux substances oxydantes.
- Observer la plus grande précision dans la reconstitution et la distribution des réactifs.
- Ne pas utiliser les réactifs appartenant à des lots différents.
- Ne pas utiliser des échantillons fortement hémolysés.
- Cette méthode permet de déterminer des concentrations de cortisol de 10 ng/mL à 500 ng/mL.
- L'administration de stéroïdes naturels ou synthétiques peut altérer les taux urinaires de cortisol.

5. PROCÉDURE

5.1. Préparation des étalons (S_0…..S_4)

Avant utilisation, laisser sur l'agitateur rotatif pendant au moins 5 minutes.
Les étalons ont les concentrations suivantes de cortisol :

	S_0	S_1	S_2	S_3	S_4
ng/mL	0	10	50	150	500

Stables jusqu'à la date de péremption du coffret.
Une fois ouverts, ils sont stables pendant 6 mois à 2÷8°C.

5.2. Préparation du conjugué dilué

Préparer immédiatement avant l'emploi.
Ajouter 10 µL de conjugué (réactif 3) à 1 mL de tampon d'incubation (réactif 2).
Mettre à agiter délicatement sur un agitateur rotatif pendant au moins 10 minutes. Stable pendant 3 heures à température ambiante (22÷28°C)

5.3. Préparation de l'échantillon :

Recueillir les urines sur 24 heures dans un récipient unique.
Si le dosage n'est pas effectué le jour même du prélèvement, conserver l'échantillon à 2÷8°C.
Stable pendant une semaine. Pour des périodes plus longues, conserver à –20°C.
Diluer les échantillons d'urine (1 + 1) avec le tampon d'incubation (par ex., 100 µL + 100 µL)

5.4. Procédure

Puisqu'il faut opérer en double, préparer deux puits pour chaque point de la courbe d'étalonnage (S_0-S_4), deux pour chaque échantillon et un pour le blanc.

Réactif	Étalon/ Contrôles	Échantillons	Blanc
Étalon S_0-S_4 /Contrôles	**10 µL**		
Échantillons dilués		**10 µL**	
Conjugué dilué	**300 µL**	**300 µL**	
Laisser incuber 1 h à +37°C. Retirer le contenu de chaque puits, laver les puits 2 fois avec 400 µL de eau distillée.			
Substrat TMB	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Laisser incuber 15 minutes à température ambiante (22÷28°C) à l'abri de la lumière.			
Solution d'arrêt	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Agiter doucement la microplaque. Lire l'absorbance (E) à 450 nm en mettant à zéro avec le blanc.			

6. CONTRÔLE DE QUALITÉ

Chaque laboratoire devrait analyser les échantillons dans la gamme des niveaux élevés, normaux et bas de cortisol urinaire pour vérifier les prestations de l'analyse. Ces échantillons devraient être traités comme inconnus et les valeurs déterminées devraient être dans chaque test effectué. Les tableaux de contrôle de la qualité devraient être observés afin de suivre les prestations des réactifs fournis. Des méthodes statistiques appropriées devraient être employées pour vérifier la tendance. Le laboratoire devrait définir des limites d'acceptabilité des prestations d'analyse. Les autres paramètres qui devraient être contrôlés incluent les interceptions de 80, 50 et 20% de la courbe d'étalonnage pour évaluer la reproductibilité. De plus, la capacité d'absorption maximale devrait être constante avec l'expérience précédente. La déviation significative par rapport aux prestations établies peut indiquer un changement non observé des conditions expérimentale ou une dégradation des réactifs du coffret. Dans ce cas, il est conseillé d'utiliser des réactifs frais afin de déterminer le motif des variations.

7. LIMITATIONS DE LA PROCÉDURE

7.1. Prestations de l'analyse

Ne pas utiliser des échantillons microbiologiquement contaminés ou des échantillons fortement lipémiques ou hémolysés. Il est important que le temps de réaction de chaque puits soit le même aux fins de la reproductibilité. Le temps de distribution des puits ne doit pas être supérieur à 10 minutes. S'il se prolonge au-delà des 10 minutes, il est recommandé de suivre l'ordre de distribution. Si vous devez utiliser plus d'une microplaque, il est conseillé de répéter la courbe dose-réponse. L'ajout de substrat TMB entraîne une réaction cinétique qui se termine par l'ajout de la solution d'arrêt. L'ajout du substrat et de la solution d'arrêt doit advenir dans le même ordre afin d'éliminer des temps de réaction différents. Les lecteurs de plaques mesurent les DO verticalement. Ne pas toucher le fond des puits. Une aspiration incomplète de la solution de lavage dans les puits peut entraîner des réplicats de mauvaise qualité et de faux résultats.

7.2. Interprétation des résultats

Si un ordinateur a été utilisé pour calculer les résultats, il faut impérativement que les valeurs des calibrateurs tombent dans les 10 % des concentrations assignées.

8. RÉSULTATS

8.1. Extinction moyenne

Calculer l'extinction moyenne (Em) de chaque point de la courbe d'étalonnage (S_0-S_4) et de chaque échantillon.

8.2. Courbe d'étalonnage

Tracer le graphique d'absorbance en fonction des concentrations des étalons (S_0-S_4). (par ex. : tracé logistique à quatre paramètres).

8.3. Calcul des résultats

Sur le graphique, faire une interpolation des valeurs d'absorbance relatives à chaque échantillon et en lire la concentration correspondante en ng/mL.
Pour calculer les concentrations dans les urines, appliquer la formule suivante:

ng/mL x Vol(mL) urines 24 h/1.000 = µg cortisol/24 heures

9. VALEURS DE RÉFÉRENCE

Les concentrations urinaires de cortisol sur 24 h sont comprises dans les intervalles suivants :
50 - 190 µg/24 heures

10. PARAMÈTRES CARACTÉRISTIQUES

10.1. Précision

10.1.1. Intra-essai

La variabilité à l'intérieur du même coffret a été déterminée en répliquant (10x) la mesure de trois sérums de contrôle différents. La variabilité intra-essai est ≤ 7%.

10.1.2. Inter-essai

La variabilité entre dosages différents a été déterminée en répliquant (10x) la mesure de trois sérums de contrôle différents avec des coffrets appartenant à des lots différents. La variabilité inter-essai est ≤ 9%.

10.2. Exactitude

L'épreuve de récupération conduite sur un échantillon enrichi avec 25 - 50 - 100 - 200 ng/mL de cortisol a donné une valeur moyenne (±SD) de 101,89% ± 4,55%.

10.3. Sensibilité

La concentration minimale de cortisol urinaire mesurable est de 2,0 ng/mL avec une limite de confiance de 95 %.

10.4. Spécificité

L'anticorps employé présente les réactions croisées suivantes, calculées à 50 % selon Abraham :

Cortisol	100%
Cortisone	10,8%
11 α-déoxycortisol	18,7%
Corticostérone	2,4%
Dexaméthasone	0,39%
Progestérone	0,1%
Aldostérone	$1x10^{-2}$ %
11αOH progestérone	$1x10^{-2}$ %
Cholestérol	< $1x10^{-6}$ %

10.5. Corrélation avec le dosage RIA

Le coffret de Cortisol urinaire (Diametra) a été comparé avec un coffret disponible en commerce. 50 échantillons de sérum ont été testés. La courbe de régression est :

$y = 1,10 x - 1,56$
$r^2 = 0,949$
y = Cortisol urinaire Diametra
x = Cortisol Immunotech RIA

11. DISPOSITIONS RELATIVES À L'ÉLIMINATION DES DÉCHETS

Les réactifs doivent être jetés conformément aux lois en vigueur.

BIBLIOGRAPHIE

1. Foster, L. B. and Dunn, R. T. Clin. Chem. 20/3 365(1974)
2. De Lacerda, et al J. Clin. Endocr. and Metab. 36,227 (1973)
3. Rolleri, E., et al Clin. Chim. Acta 66 319 (1976)
4. Kobayashi, Y., et al Steroids, 32 no 1(1978)
5. Akarawa, et al Anal. Biochem. 97 248 (1979)

Ed. 12/2010 **DCM018-8**

DiaMetra S.r.l. - Siège social : Via Garibaldi, 18 – 20090 SEGRATE (MI) Italie
Tél. 0039-02-2139184 – 02-26921595
Fax 0039–02–2133354.
Fabricant : Via Giustozzi, 35/35a – Z.I Paciana – 06034 FOLIGNO (PG) Italie
Tél. 0039-0742–24851
Fax 0039–0742–316197
Courriel : info@diametra.com

	DIA.METRA SRL	
Mod. PIS	**NOTICE D'INFORMATION**	

IT *Spiegazione dei simboli* **GB** *Explanation of symbols* **FR** *Explication des symboles* **ES** *Significado de los simbolos*

DE *Verwendete Symbole* **PT** *Explicaçao dos simbolos*

IVD	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
REF	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Nûmero de catálogo Réferéncès du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d 'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l 'uso Consultar instruções para uso	LOT	DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 Σ = xx	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes	**Cont.**	DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitaciôn de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação			

SUGGESTIONS POUR LA RÉSOLUTION DES PROBLÈMES / DÉPANNAGE

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'essai

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouots ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs